

**Zur photochemischen Hydrolyse
aliphatischer Ester der Phosphorsäure
durch ultraviolettes Licht**

Klaus Gubitx

ZUR PHOTOCHEMISCHEN HYDROLYSE
ALIPHATISCHER ESTER DER PHOSPHORSÄURE
DURCH ULTRAVIOLETTES LICHT

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Klaus Gubitz

aus

Heidenheim Brenz

Oktober 1959



5349/60

Berichterstatter: Prof. Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1959

Druck: Steinbauer u. Hagemann, München 2

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München unter Anleitung seines Direktors, Herrn Professor Dr. Eugen Bamann, in der Zeit von November 1956 bis Juli 1959 angefertigt.

Mein hochverehrter Lehrer vermittelte mir in dieser Zeit einen gründlichen Einblick in moderne wissenschaftliche Probleme und Arbeitsmethoden, brachte mir großes Vertrauen und Wohlwollen entgegen und war stets bereit, mir wertvolle fachliche Hinweise zu geben. Ich schulde ihm dafür aufrichtigen und tiefempfundenen Dank.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle Herrn Privatdozenten Dr. Heinz Trappmann für seine vielen, fördernden Ratschläge Dank sagen.

Bei Herrn Professor Dr. Ludwig Hörhammer, Vorstand des Instituts für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, bedanke ich mich für lehrreiche wissenschaftliche Exkursionen und sein persönliches Interesse.

In meinen Dank schließe ich alle Professoren und Dozenten ein, die mir während der Durchführung dieser Arbeit ihre Förderung zuteil werden ließen.

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Ziel und Erkenntnis der Untersuchung	1
I. Problemstellung	1
II. Abhängigkeit der Spaltung von der Esterstruktur	2
1) Allgemeines	2
2) Diskussion der Versuchsergebnisse	2
a) Mono-, Di- und Tri-Ester	2
b) Substituierte Ester	6
3) Die experimentellen Befunde der Spaltung durch ultraviolettes Licht im Vergleich mit den Ergebnissen bei der Hydrolyse mit- tels Wasserstoff-, Hydroxyl- und Metall-Ionen sowie bei der Zer- legung durch Fermente	8
III. Zum Wesen der Reaktion	11
1) Die Photolyse der Esterbindung im Vergleich zur Hydrolyse durch Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen	11
2) Der Einfluß der Esterkonzentration auf den Umsatz	12
3) Das UV-Absorptionsspektrum	14
IV. Der Einfluß von Zusätzen auf den Verlauf der Spaltung von Phosphorsäureestern durch ultraviolettes Licht	16
1) Ammoniak-Ammoniumchlorid	16
a) In Abhängigkeit von der Zeit	16
b) In Abhängigkeit vom p_H -Wert	18
2) Kaliumchlorid und Kaliumsulfat	21
V. Zusammenfassung	23
B. Zur Methodik	24
I. Substrate	24
II. Lichtquelle	25
III. Der Versuchsansatz	25
IV. Bestimmung des anorganischen Phosphats	26
C. Literaturverzeichnis	27

A. Ziel und Erkenntnis der Untersuchung

I. Problemstellung

Es ist die Aufgabe dieser Untersuchung, Zusammenhänge aufzuklären, die bei der Einwirkung des ultravioletten Lichts auf aliphatische Phosphorsäureester bestehen. Nicht uninteressant erscheint es, die Erkenntnisse jenen gegenüberzustellen, welche im Verlauf der letzten Zeit bei der Zerlegung dieser Estersäuren durch saure und alkalische Hydrolyse (5, 22, 24, 25), mit Hilfe der entsprechenden Fermente (13, 14, 15, 17, 40) und mittels katalytisch aktiver Metall-Ionen, vornehmlich der Ionen der seltenen Erdmetalle, (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 50) erzielt worden sind.

Die Tatsache, daß Phosphorsäureester durch ultraviolettes Licht gespalten werden, ist bekannt (20, 29). Dies nützten R.S. Bandurski und B. Axelrod (20), um den Nachweis von einfachen organischen Phosphorsäureestern sowie von Nukleotiden und Phosphatiden auf papierchromatographischem Weg zu vereinfachen, M. W. Seraydarian (46, 47) beobachtete, daß eine Lösung der Esterbindung stets dann erfolgt, wenn die entsprechenden Substrate einer hohen Intensität ultravioletten Lichts mit einer Wellenlänge von ca. 2600 Å ausgesetzt sind.

Das Ziel der Arbeit ist durch einen systematischen Vergleich erreicht worden, wobei die Abhängigkeit des Ausmaßes der Spaltung von der Kettenlänge des organischen Restes, von Isomerieeffekten, vom Grad der Veresterung der Substrate, von der Anwesenheit elektronegativer Substituenten in der Estermolekel sowie von der Höhe der Substratkonzentration und von der Gegenwart verschiedener Zusätze im Reaktionsmilieu festgelegt wurde.

II. Abhängigkeit der Spaltung von der Esterstruktur

1) Allgemeines

Vorliegenden Arbeiten (20, 29, 37) ist zu entnehmen, daß sich die Bestrahlung aliphatischer Phosphorsäureester in wäßriger Lösung mit ultraviolettem Licht als eine äußerst wirksame Methode zur Hydrolyse dieser mitunter recht stabilen Ester erweist.

Unsere Befunde zeigen nun Gesetzmäßigkeiten auf, die sowohl für die Deutung der vorliegenden Ergebnisse, aber auch als Fundament für weitere Untersuchungen von Interesse sind:

- a) Das Ausmaß der Spaltung nimmt mit zunehmender Kettenlänge des organischen Restes ab. Es ergibt sich, abgesehen vom Anfangsglied dieser Reihe - dem Methylphosphat -, die Sequenz:

Äthyl- > n-Propyl- > n-Butyl- > n-Cetylphosphat.

Diese Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Länge des organischen Restes konnte auch am Beispiel des iso-Propyl- und des primären iso-Butylphosphats festgestellt werden, wobei das erstere wesentlich rascher als das letztere zerlegt wird.

- b) Im Falle des Vorhandenseins eines elektronegativen Substituenten (-OH) im alkoholischen Rest des n-Propyl- oder iso-Propylphosphats ergibt sich verglichen mit den nicht substituierten Estern eine starke Steigerung der Zerfallsgeschwindigkeit.
- c) Mit zunehmendem Grad der Veresterung der Phosphorsäure kommt es zu einer Verringerung des Umsatzes. Im Gegensatz zur metallionenkatalytischen sowie zur enzymatischen Hydrolyse erfolgt bei der photochemischen Einwirkung auf diese Substrate auch noch eine Aufspaltung der Tri-Ester.

2) Diskussion der Versuchsergebnisse

a) Mono-, Di- und Tri-Ester

Es fällt auf, daß das Ausmaß der Spaltung zwischen p_H 4.0 und 5.5 am geringsten ist. Im p_H -Bereich zwischen p_H 4.0 und 2.0 sowie im schwächer sauren und im alkalischen Milieu steigt die Hydrolysekurve regelmäßig an. ⁺)

⁺) Im stark sauren Bereich (um p_H = 2 und darunter) sinkt die Hydrolysegeschwindigkeit wieder ab und zwar bei den niederen Homologen stärker als bei den Estern mit längerer organischer Kette. W. W. Butcher und F. H. Westheimer machen bei der Hydrolyse mittels Wasserstoff-Ionen eine ähnliche Beobachtung (22) und erklären sie mit einer von der Wasserstoffionen-Konzentration stark abhängigen Zerfallsgeschwindigkeit auftretender Anlagerungsverbindungen.

Ausgehend von diesem Befund ergibt sich die Vorstellung, daß für die Spaltung der aliphatischen Phosphorsäureester durch ultraviolette Strahlen das Mono-Anion $\text{ROPO}_3\text{H}'$ am schwersten zugänglich ist. Sehr gut werden hingegen das Di-Anion ROPO_3'' und die undissoziierte Säure hydrolysiert.

Ohne den späteren Bemerkungen zum Reaktionsverlauf vorausgreifen zu wollen, sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß eine ähnliche p_H -Abhängigkeit bei der Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Mono- und Polynukleotiden mittels Röntgenstrahlen gefunden wurde (48).

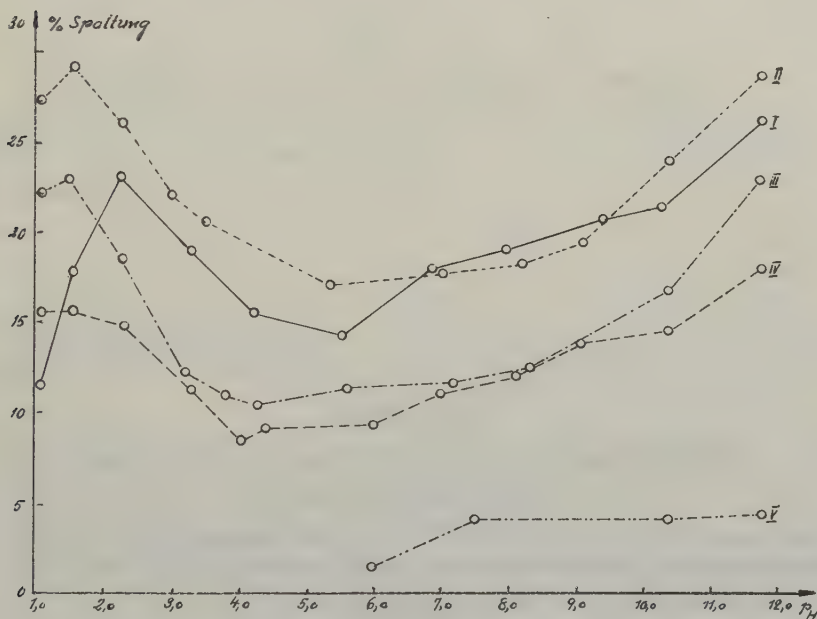


Abbildung 1

Aktivitäts- p_H -Kurven bei der Spaltung nicht substituierter, aliphatischer Mono-Ester der Phosphorsäure mit unverzweigtem organischen Rest

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 30, beim Mono-n-cetylphosphat [†]) 60 Min.; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; $t = 30^\circ$)

Methylphosphat	I	—	n-Propylphosphat	III	— · — · —	n-Cetylphosphat	V
Äthylphosphat	II	— · — · —	n-Butylphosphat	IV	— · — · —		

[†]) Eine Bestrahlung des Mono-n-cetylphosphorsäureesters unterhalb eines p_H -Wertes von 6.0 scheitert an der schlechten Löslichkeit der freien Estersäure in Wasser.

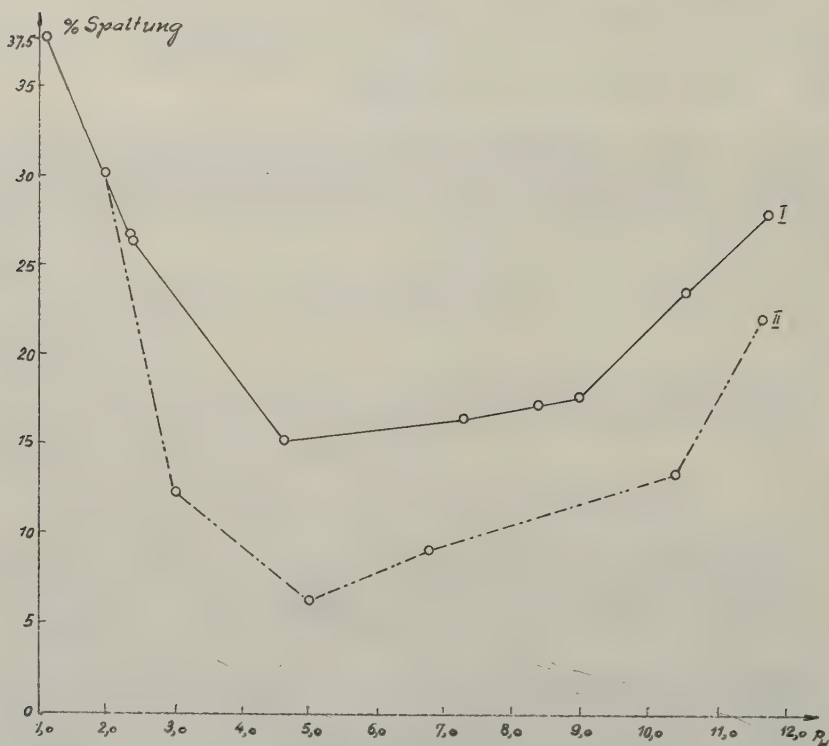


Abbildung 2

Aktivitäts-pH-Kurven bei der Spaltung von iso-Propyl- und primärem iso-Butylphosphat

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 30 Min.; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; t = 30°)

I iso-Propylphosphat ○————○ II iso-Butylphosphat ○-----○

Wie die folgenden Abbildungen 3 und 4 zeigen, ist der Reaktionsverlauf in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei der photochemischen Hydrolyse von Di- und Tri-Estern ein ähnlicher. Allerdings nimmt die Intensität, mit der anorganisches Phosphat abgespalten wird, erwartungsgemäß über den Di- zum Tri-Ester ab, da die Reaktion wahrscheinlich unter der Bildung von Mono- bzw. Di-Estern mehrere Phasen durchläuft, von denen nur die letzte, nämlich die Freisetzung des anorganischen Phosphats bestimmt wird. Diese erfordert z.B. bei Tri-Estern die Lösung von 3 Esterbindungen.

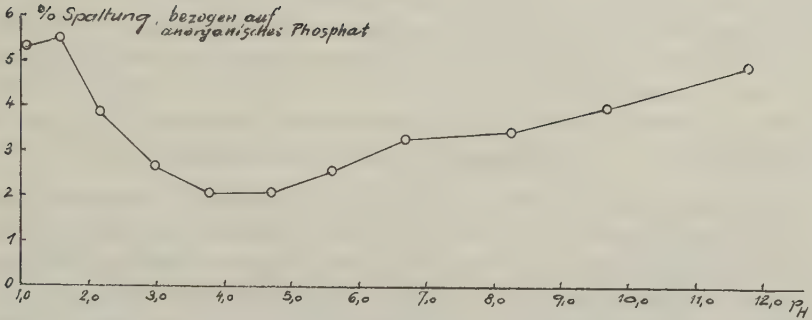


Abbildung 3

Aktivitäts-p_H-Kurve bei der Spaltung von Di-äthylphosphat

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 30 Min.; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; t = 30°)

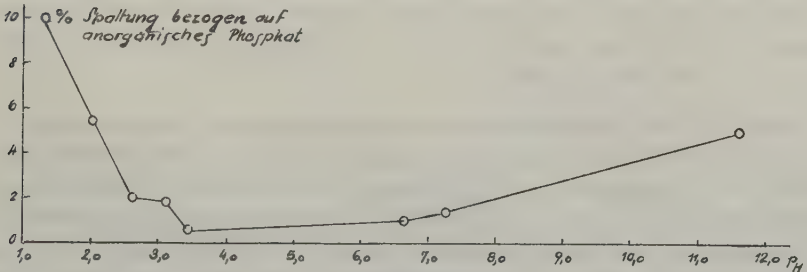


Abbildung 4

Aktivitäts-p_H-Kurve bei der Spaltung von Tri-äthylphosphat

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 120 Min.; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; t = 30°)

Bei der Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeit innerhalb der homologen Reihen der aliphatischen n- und iso-Phosphorsäureester (Abb. 1 und 2) dürfte, abgesehen von anderen Gesetzmäßigkeiten, z.B. dem Trefferprinzip, die Erhöhung der elektronenabstoßenden Wirkung mit Zunahme des organischen Restes von Bedeutung sein. Auf einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Verseifungsgeschwindigkeit und Esterkonstitution bei der durch Metall-Ionen katalysierten Hydrolyse von Phosphorsäureestern weisen E. Bamann, J. Riehl und R. Nicolai (16) hin.

Die größere Geschwindigkeit der Hydrolyse des iso-Propyl- gegenüber derjenigen des n-Propylphosphats (vgl. Abb. 1 u. 2) bei der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht steht aber dazu im Widerspruch; denn wäre die elektronenabstoßende Wirkung allein ausschlaggebend, so müßte das gegenüber der n-Propylgruppierung stärker elektronenabstoßende iso-Propylphosphat langsamer anstatt schneller verseift werden. Die Frage, ob beim iso-Propylphosphat den beiden, der Esterbindung benachbarten, Methylgruppen ein polarisierender Effekt zukommt, muß verneint werden, da eine Polarisierung nur durch elektronenabstoßende Gruppen erfolgt. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in der sekundären Anordnung der Esterbindung.

b) Substituierte Ester

Durch die Einfügung eines elektronegativen Substituenten in die Estermolekel kommt es zu einer nicht unbeträchtlichen Steigerung der Hydrolyse. Diese Beobachtung gilt für den gesamten p_H -Bereich, vom stark sauren über das neutrale bis zum stark alkalischen Gebiet.

Da die Stellung des Substituenten zur Esterbindung einen Einfluß besitzt, dürfte der Grund hierfür in Polarisierungseffekten liegen. In Übereinstimmung mit der von E. Bamann und W.-D. Mütterlein (12) im Falle der Metallionen-Katalyse geäußerten These ist das Ausmaß der Hydrolyse dann am größten, wenn zwei Substituenten am Estermolekül in α -Stellung zur Esterbindung stehen. Wie Abbildung 5 zeigt, wird diese Forderung allerdings im stark sauren Milieu nicht mehr erfüllt; es kommt hier zu einer Überschneidung der Hydrolysekurven der Propylenglykol-mono- und der Glycerin- β -phosphorsäure.

Eine weniger rasche Spaltung als bei α -substituierten Estern tritt bei Verbindungen mit einem Substituenten in β -Stellung ein, bzw. dann wenn sich ein Substituent in α - und der andere in β -Stellung befinden, was ebenfalls in Übereinstimmung mit der vorher genannten Auffassung steht.

Für die starke Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit der substituierten und der iso-Ester in p_H -Bereichen unterhalb $p_H = 3$, die wir bei den nicht substituierten Estersäuren nicht beobachteten, können wir noch keine Erklärung geben.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß einige Autoren (5, 22, 25) im Falle der sauren Verseifung dieser Verbindungen die Ansicht vertreten, daß hier der Hydrolyse weniger die Lösung der (O-P)-Bindung als vielmehr der (C-O)-Bindung zu Grunde liegt.

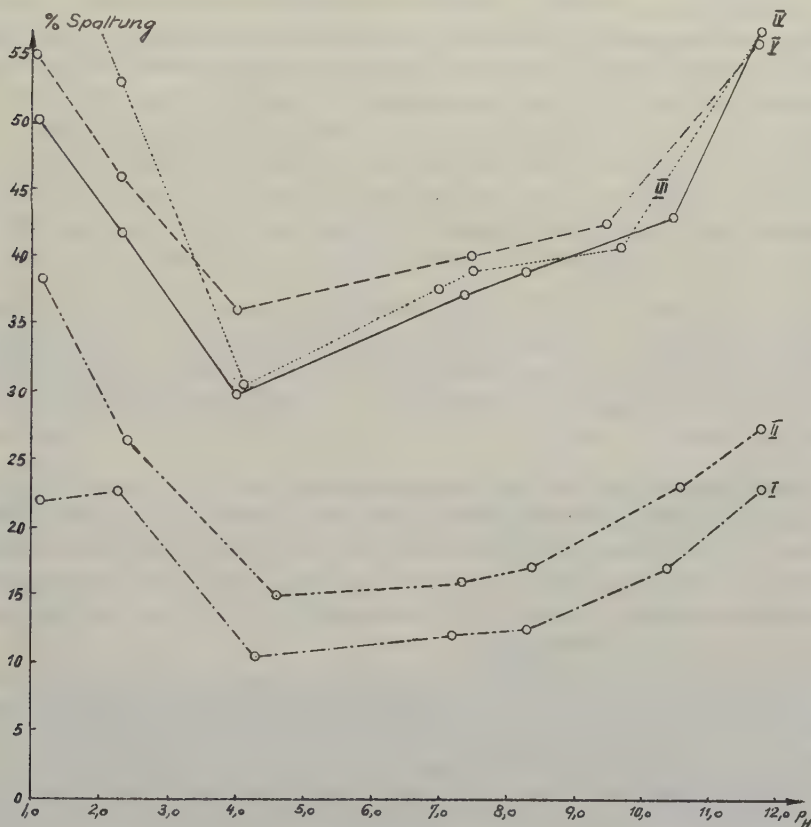


Abbildung 5

Aktivitäts- p_H -Kurven bei der Spaltung substituierter Mono-Ester
im Vergleich mit n- und iso-Propylphosphat

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 μ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 30 Min.; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; $t = 30^\circ$)

I n-Propylphosphat	○ — — — — — ○
II iso-Propylphosphat	○ — — — — — ○
III Propylenglykol-monophosphorsäure	○ — — — — — ○
IV Glycerin- α -phosphorsäure	○ — — — — — ○
V Glycerin- β -phosphorsäure	○ — — — — — ○

3) Die experimentellen Befunde der Spaltung durch ultraviolettes Licht
im Vergleich mit den Ergebnissen bei der Hydrolyse mittels
Wasserstoff-, Hydroxyl- und Metall-Ionen sowie bei
der Zerlegung durch Fermente

Die Mono-Ester der Phosphorsäure sind Alkali gegenüber sehr stabil; sie sind mäßig stabil bei einem p_H -Wert von 1 oder 2, werden aber bei $p_H = 4$ sowie in stark saurer Lösung gut hydrolysiert (5, 24, 25). Diese Tatsache, daß nämlich das Mono-Anion $ROPO_3H'$ eine weitaus raschere Hydrolyse erfährt als das Di-Anion $ROPO_3''$ und die undissoziierte Säure $ROPO_3H_2$, erklären W. W. Butcher und F. H. Westheimer (22): Die Stabilität des Di-Anions gegenüber Hydroxyl-Ionen hätte ihre Ursache in elektrostatischen Gründen; im Falle der Hydrolyse im stark sauren Milieu würden zusätzliche Mechanismen dominieren, welche durch die Lösung der (C-O)-Bindung hervorgerufen sein sollen.

Bei der Einführung elektronegativer Substituenten in das Estermolekül erfolgt durch Polarisierung der Esterbindung eine Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit ⁺) (22, 25). Durch eigene Untersuchungen konnte der die Hydrolyse fördernde Einfluß der elektronegativen Substituenten an einigen Beispielen bestätigt werden (Tab. 1 s. S. 9).

Beim Vergleich der Ergebnisse der Metallionen-Katalyse (12, 16) mit jenen der Spaltung aliphatischer Phosphorsäureester durch ultraviolettes Licht im alkalischen Milieu werden weitgehend gleiche Eigentümlichkeiten erkannt: Mit zunehmender Kettenlänge nimmt das Ausmaß der Hydrolyse ab; bei Anwesenheit von elektronegativen Substituenten in der Estermolekel kommt es zu einer Steigerung der Zerfallsgeschwindigkeit.

Ein anderes Bild ergibt sich im Falle der enzymatischen Spaltung: Hier nimmt - im Gegensatz zu den beiden vorher genannten Hydrolyseformen - die Intensität der Spaltung im alkalischen bzw. sauren Gebiet vom Methyl- zum n-Amylphosphorsäureester zu (14, 40). Die Ursache dafür liegt in einem Ansteigen sowohl der Affinität zu den Substraten als auch der Zerfallsgeschwindigkeit der Reaktionszwischenverbindungen. Allerdings kommt es auch hier bei der Einführung elektronegativer Substituenten durch Koordinationsmöglichkeiten und Polarisierungseffekte zu einer Erhöhung des Umsatzes (40).

⁺) Auch bei der Metallionen-Katalyse hat die Einfügung elektronegativer Substituenten in das Estermolekül eine Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit zur Folge. Diese Steigerung beruht ebenfalls auf polarisierenden Effekten (12), doch ist hier außerdem noch die Möglichkeit der Koordination zwischen Metall-Ion und Substituent in Betracht zu ziehen (22, 26).

Tabelle 1

Die Hydrolyse von Mono-Estern der Phosphorsäure mittels Wasserstoffionen
bei p_H 4.0 und p_H 7.0

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Hydrolysedauer beträgt 2, 4 bzw. 6 h; das p_H wurde mit HCl eingestellt; t = Siedetemperatur des Versuchsansatzes)

p_H	4.0			7.0		
Reaktionszeit	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
n-Propylphosphat	6.9%	13.1%	20.4%	3.0%	5.1%	7.3%
iso-Propylphosphat	11.2%	22.3%	33.7%	4.5%	9.0%	14.0%
Propylenglykolmono-phosphorsäure	11.6%	23.1%	35.7%	4.4%	9.1%	14.2%
Glycerin- α -phosphorsäure	15.4%	30.4%	44.0%	4.5%	9.3%	13.7%
Glycerin- β -phosphorsäure	29.4%	50.6%	70.0%	9.2%	18.4%	27.3%

Von Interesse ist weiterhin ein Vergleich des Verhaltens von Di- und von Tri- Estern: Wasserstoff-Ionen gegenüber beobachtet man eine zunehmende Stabilität vom Mono- über den Di- zum Tri-Ester. Die gleichen Verhältnisse finden wir, wie in einem früheren Kapitel dargelegt wurde, im Falle der Einwirkung von ultraviolettem Licht auf die genannten Estergruppen. Bei der Hydrolyse durch Enzyme (13, 14) und gewisse Metall-Ionen (16) unterscheidet sich das gewonnene Bild von dem vorstehend erwähnten, insofern als Tri-Ester ohne funktionelle Gruppen $^+)$ als unspaltbar gefunden werden.

$^+)$ Für die Spaltung von Diphenyl-mono-p-nitrophenyl-phosphorsäure- und Dimethyl-mono-cholinyphosphorsäure-ester auf enzymatischem Wege (1, 2) werden von einigen Autoren (38, 53, 54) eigene Enzyme bzw. Enzymsysteme angenommen. Eine Untersuchung, wie sich Tri-Ester mit funktionellen, zur Koordination befähigten Gruppen Metall-Ionen und Enzymen gegenüber verhalten, wird gegenwärtig von E. Bamann und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

Salzartige Reaktionszwischenprodukte, wie sie für den Reaktionsablauf gefordert werden, sind nämlich nur bei Mono- und Di-Estern möglich (19, 50). Parallel zum Basenbindungsvermögen der Ester verhält sich die Affinität zum Enzym bzw. Metallionen-Katalysator, wodurch erklärbar wird, daß die Di-Ester einen geringeren Umsatz als die entsprechenden Mono-Ester ergeben ⁺). Bei der photochemischen Hydrolyse dürfen diese Überlegungen jedoch vernachlässigt werden.

⁺) Über den Einfluß der Substratkonzentration auf das Verhältnis der Umsätze von Mono- und Di-Estern siehe: E. Bamann u. J. Riehl, Biochem. Z. 327, 136 (1955).

III. Zum Wesen der Reaktion

1) Die Photolyse der Esterbindung im Vergleich zur Hydrolyse durch Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen

Nach dem Gesetz von Grotthus-Draper (15, 41) liegt eine photochemische Reaktion stets dann vor, wenn ein System durch Absorption optischer Strahlung chemisch verändert wird, und wenn diese chemische Veränderung nicht lediglich die Folge einer durch die Bestrahlung bewirkten lokalen, auch thermisch erreichbaren Temperaturerhöhung ist. Eine Überprüfung dieser Voraussetzung erwies sich als unumgänglich, da bei der als Lichtquelle verwendeten Quecksilber-Hochdrucklampe vom Brenner im hohen Maß thermische Energie abgestrahlt wird (27, 36). Diese Tatsache gewinnt bei der vorliegenden Untersuchung umsomehr an Bedeutung, weil bei der verwendeten Apparatur (siehe Teil B) trotz intensiver Kühlung immer ein kleiner Teil der Substratlösung während der Bestrahlung, - wenn auch nur für kurze Zeit -, mit einer Zone, in der relativ hohe Temperatur herrscht, in Berührung gerät.

Die Ergebnisse der Hydrolyse mittels Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen (24, 25) lassen jedoch, wie nachstehende Aktivitäts- p_H -Kurve am Beispiel des Mono-äthylphosphats zeigt, auf einen anderen Reaktionsablauf schließen. Die Wasserstoffionen-Hydrolyse weist im Gegensatz zur photochemischen Spaltung des Esters (vgl. Abb. 1) im p_H -Bereich von 4-5 ein ausgesprochenes Maximum auf, fällt gegen pH 1 ab ⁺), während im alkalischen Milieu die aliphatischen Ester der Phosphorsäure praktisch unspaltbar sind.

⁺) Bei p_H -Werten < 1 fand A. Desjobert (24, 25), daß das Ausmaß der Spaltung des Mono-äthylphosphats wieder stark zunimmt (vgl. S. 6; 7).

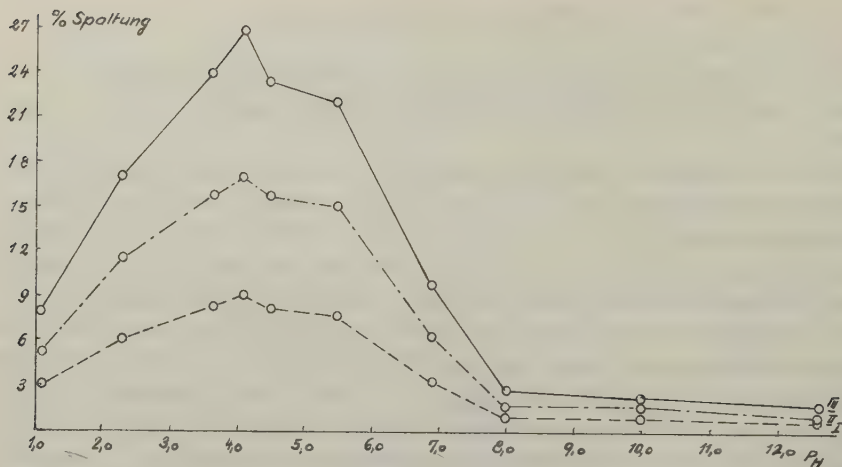


Abbildung 6

Aktivitäts- p_H -Kurven für die Hydrolyse des Mono-äthylphosphats durch Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 μ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; t = Siedetemperatur des Versuchsansatzes)

Hydrolyse des Esters nach 2 h ——— I ○ ——— ○
 4 h - - - - - II ○ - - - - - ○
 6 h - III ○ ○

2) Der Einfluß der Esterkonzentration auf den Umsatz

Bei kurzer Bestrahlung (150 sec.) von Mono-äthylphosphat-Lösungen mit ultravioletttem Licht werden unabhängig von der Konzentration des Esters (mol/50 - mol/1000) etwa gleiche Mengen anorganisches Phosphat abgespalten. Dies bedeutet eine Erfüllung des Gesetzes nach Bunsen-Roscoe (41), welches besagt, daß die Menge photochemisch umgesetzter Substanz lediglich proportional dem Produkt von Zeit mal Strahlungsfluß ist. In unseren Versuchen ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2

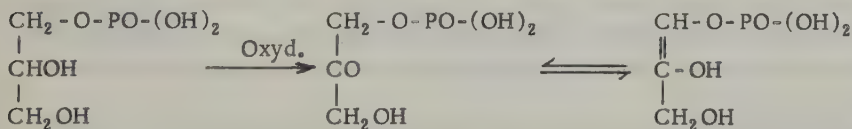
Die Abhängigkeit des Umsatzes von der Esterkonzentration

(Der Versuchsansatz besteht aus jeweils 70 ml Substratlösung ohne Zusatz; die Bestrahlungszeit beträgt 150 sec.; $t = 30^{\circ}$)

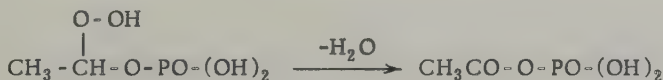
Esterkonzentration	mol/1000	mol/500	mol/250	mol/100	mol/50
Abgespaltenes Phosphat ausgedrückt in γ P	18	23	22.4	18	24.8

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen dürfen wir die Spaltung der aliphatischen Phosphorsäureester als eine direkte photochemische Reaktion (41) bezeichnen. Welcher Mechanismus ihr zu Grunde liegt, ist bis jetzt noch nicht geklärt.

G. Scholes, J. Weiss und G. R. A. Johnson (33, 43, 44) untersuchten den Reaktionsverlauf bei der Zerlegung von Glycerin- α - und Glycerin- β -phosphorsäure sowie von Monoäthylphosphat in wäßriger Lösung durch Röntgenstrahlen. Sie kommen zu dem Schluß, daß die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Substrate eine indirekte ist, d.h. daß sie über die aus dem Wasser gebildeten, freien Radikale H und OH führt. Diese Radikale oxydieren die genannten Substrate, z.B. die Glycerin- α -phosphorsäure an der sekundären alkoholischen Gruppe, wobei sehr labile Phosphorsäureester entstehen.



Im Falle des Mono-äthylphosphats konnten die genannten Autoren beweisen, daß die oxydierende Wirkung der freien Radikale in Anwesenheit von Sauerstoff zu der Bildung eines organischen Hydroperoxyds führt, aus welchem sofort das sehr labile Acetylphosphat (34) entsteht.



Für die Abspaltung von anorganischem Phosphat aus komplizierter gebauten Verbindungen, z.B. aus Polynukleotiden, werden ähnliche Reaktionsvorgänge angenommen. Hierbei konnte die Beobachtung gemacht werden, daß, ähnlich wie bei unseren Befunden, ein Minimum in der Phosphatabspaltung zwischen p_H 4 und 5 auftritt (48).

Das Energieniveau der ultravioletten Strahlen liegt jedoch erheblich niedriger als im vorstehend geschilderten Fall, und eine Photoionisation, wie sie bei den Röntgenstrahlen in Erscheinung tritt, stellt einen seltenen Ausnahmefall dar (41).

Durch die Absorption eines Lichtquants wird die betreffende Molekel in einen Zustand höherer Energie gebracht und im thermodynamischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung gestört, d.h. sie wird angeregt. Diese energiereiche Molekel, die durch ungepaarte Elektronen gekennzeichnet ist, kann direkt oder über Radikale bzw. Atome, die durch Homolyse von Einfachbindungen entstehen, die stabilen Endprodukte der Photoreaktion bilden (41).

Der genaue Angriffspunkt der Lichtquanten bei der photochemischen Spaltung der Phosphorsäureester ist bis jetzt nicht ermittelt worden, doch dürfte er in der (C-O)- bzw. (O-P)-Bindung der Estergruppierung zu suchen sein.

3) Das UV-Absorptionsspektrum

Die aliphatischen Phosphorsäureester absorbieren vor allem im mittleren und kurzwelligen UV-Bereich (UV. - B und UV. - C). Bei 2600 Å ist eine Unterbrechung in der sonst kontinuierlich ansteigenden Kurve vorhanden. Ob es sich hierbei um ein Maximum handelt, und dieses mit der Spaltung in Zusammenhang gebracht werden kann, muß vorerst noch offenbleiben. Zur Beleuchtung dieser Frage sei darauf hingewiesen, daß M.W. Seraydarian (46) bei Mono-Nukleotiden eine Lösung der Phosphorsäureesterbindung beobachten konnte, wenn diese Stoffe einer hohen Intensität ultravioletten Lichts mit einer Wellenlänge von 2600 Å ausgesetzt sind.

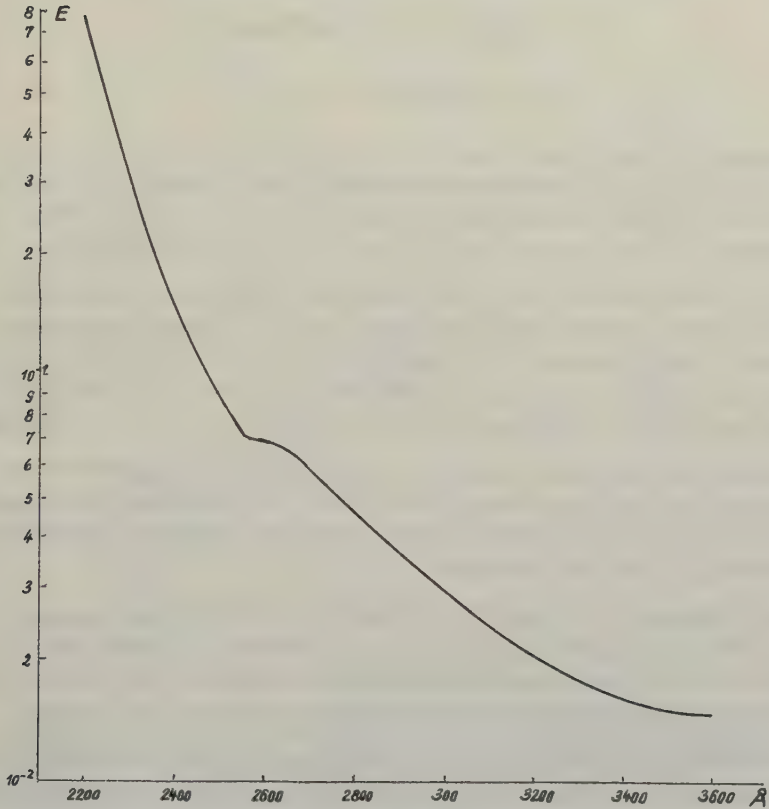


Abbildung 7

UV-Absorption einer wäßrigen Lösung von Calcium- α -glycerinophosphoricum

(Konzentration mol/25, entsprechend 1240 μ P/ml; verwendetes Gerät: Zeiss-Opton-Spektralphotometer mit Monochromator M 4 Q; Küvetten 1.0 Q)

IV. Der Einfluß von Zusätzen auf den Verlauf der Spaltung von Phosphorsäureestern durch ultraviolettes Licht

1) Ammoniak - Ammoniumchlorid

a) In Abhängigkeit von der Zeit

Bestrahlen wir aliphatische Phosphorsäureester in einem System, das 7 ml 2.5n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Pufferlösung nach Michaelis (49) in 70 ml Versuchsansatz enthält, dann erfolgt bei einem p_H von 8.1-8.25 der Umsatz in Abhängigkeit von der Zeit nach bereits beschriebenen Gesetzmäßigkeiten:

Mit zunehmender Kettenlänge des organischen Restes nimmt das Ausmaß der Hydrolyse ab; dabei ist die Ausnahmestellung des Mono-methylphosphats entschieden ausgeprägter als bei der Bestrahlung unter Zusatz von Salzsäure bzw. Kalilauge. Im System Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer liegt der Kurvenverlauf dieses Esters zwischen dem des Mono-n-butyl- und Mono-n-amyolphosphats.

Auch die isomeren Derivate zeigen wiederum diese Abhängigkeit von der Kettenlänge des organischen Restes. Ferner werden sie im vorliegenden Reaktionssystem ebenfalls etwas schneller als die entsprechenden Ester mit unverzweigter Kette im organischen Teil zerlegt.

Beim Vergleich der Hydrolyse in Anwesenheit von Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer gegenüber der Zerlegung unter Zusatz von Kalilauge fällt auf, daß der erzielte Umsatz im ersten Fall entschieden höher ist. Der Versuch einer Erklärung für diese Beobachtung wird im folgenden Abschnitt b) gemacht.

Bei der Bestrahlung des Tri- und Di-äthylphosphats kommt es ebenfalls zu einer Steigerung des Umsatzes gegenüber der Spaltung in Anwesenheit von Kalilauge. Charakteristisch für den Kurvenverlauf der Hydrolyse dieser Ester durch ultraviolettes Licht ist die Ausbildung eines autokatalytischen Anstiegs, der seine Erklärung in der abnehmenden Stabilität der Substrate vom Tri- über den Di- zum Mono-Ester findet.

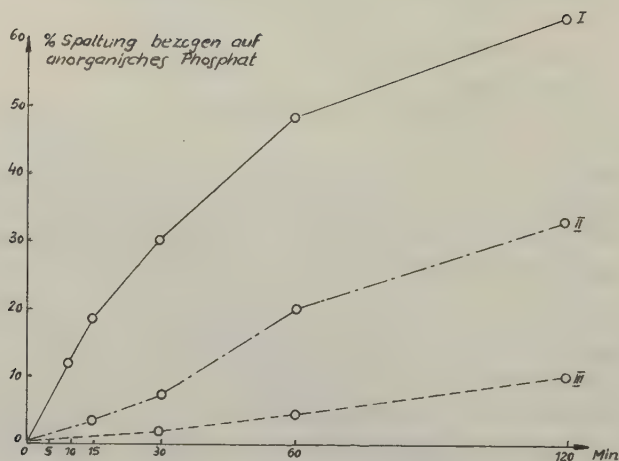


Abbildung 9

Die Hydrolyse von Mono-, Di- und Tri-äthylphosphat in Abhängigkeit von der Zeit bei p_H 8.1 - 8.25

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration und 7 ml 2.5n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; $t = 30^\circ$)

Mono-äthylphosphat	I	○ — — — — — ○ — — — — — ○
Di-äthylphosphat	II	○ - - - - - ○ - - - - - ○
Tri-äthylphosphat	III	○ ······ ○ ······ ○

b) In Abhängigkeit vom p_H -Wert

Während die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Phosphorsäureestern bei der Bestrahlung mit ultravioletttem Licht mit steigender Alkalität zunimmt, sofern diese durch Erhöhung der KOH-Konzentration herbeigeführt wird, kommt es bei Anwesenheit von Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer mit zunehmender Alkalität zu einem starken Abfall der Spaltungsintensität.

Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß mit Zunahme der Ammoniak-Konzentration, die mit der Erhöhung der Alkalität verbunden ist, Konkurrenzreaktionen in steigendem Maße ablaufen, da auch Ammoniak photochemisch angreifbar ist (28, 39, 51). In Wellenbereichen unter 2400 Å kommt es unter Ausbildung mannigfaltiger Zwischenprodukte zu seiner Photolyse. Es besteht daher die

Möglichkeit, - unter Berücksichtigung der hohen Empfindlichkeit photochemischer Reaktionen gegenüber der Zusammensetzung des Reaktionsgutes (42) -, daß diese Stoffe einen hindernden Einfluß auf die Hydrolyse der Phosphorsäureester mittels ultraviolettem Lichtes ausüben; und zwar in der Weise, daß sie einen Teil der zur Spaltung der Ester notwendigen Strahlungsenergie absorbieren.

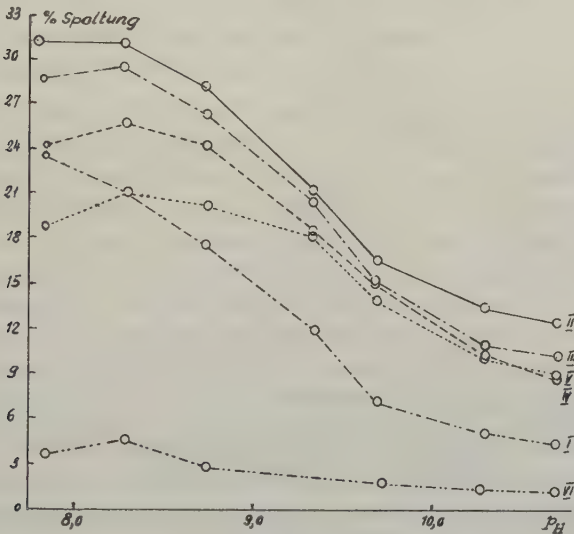


Abbildung 10

Alkalische Aktivitäts- p_H -Kurven bei der Spaltung aliphatischer Mono-Ester der Phosphorsäure in Anwesenheit von Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration und 7 ml 2.5n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; die Bestrahlungszeit beträgt 30 Min.; $t = 30^\circ$)

- | | | | |
|----------------------|---------|--------------------|---------|
| I Methylphosphat | ○-----○ | IV n-Butylphosphat | ○-----○ |
| II Äthylphosphat | ○-----○ | V n-Amylphosphat | ○-----○ |
| III n-Propylphosphat | ○-----○ | VI n-Cetylphosphat | ○-----○ |

Bei der Anwendung anderer Puffergemische, wie Veronal-Acetat, Essigsäure-Natriumacetat, Citrat-Salzsäure und Weinsäure-Natriumtartrat (49), konnten ähnliche Feststellungen gemacht werden. Eine genaue Fixierung der p_H -Werte durch Pufferlösungen ist somit, - so wünschenswert sie an und für sich wäre, - nicht möglich.

Unter den geschilderten Reaktionsbedingungen (Anwesenheit von Pufferlösungen) weisen die Hydrolysekurven von Mono-n-propyl-, Mono-n-butyl-, Mono-n-amyl und Mono-n-cetylphosphat einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Anstieg bis p_H 8.3 auf, um erst dann mit zunehmender Alkalität des Versuchsansatzes abzufallen. Für den Anstieg kann bislang keine Erklärung gegeben werden.

Eine Erhöhung der Pufferkonzentration im Ansatz führt, - vorausgesetzt daß die Relation zwischen Hydroxyl- und Chlorid-Ionen erhalten bleibt, - zu keiner Änderung des Reaktionsverlaufs. Vergrößert man jedoch nur die Konzentration der im Reaktionsgemisch anwesenden Chlorid-Ionen, etwa durch Zugabe von Kaliumchlorid-Lösung, so wird der Umsatz gesteigert. Diese Tatsache läßt den Schluß zu, daß der Anwesenheit von Chlorid-Ionen im Reaktionsgut ein anregender Effekt zukommt. Damit würde auch das Absinken der Spaltungsintensität bei Pufferung durch Ammoniak-Ammoniumchlorid im stärker alkalischen Gebiet erklärbar werden, da mit der Erhöhung der Alkalität eine Verringerung der Chlorid-Ionen-Konzentration verbunden ist.

Die Abnahme der Chlorid-Ionen-Konzentration wirkt sich somit in gleichem Sinne aus wie die Zunahme der Ammoniak-Konzentration. Das Absinken der Hydrolyse-Intensität (Abb. 10) mit zunehmendem p_H geht demnach in Anwesenheit von Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer auf eine Einflußnahme beider Faktoren zurück.

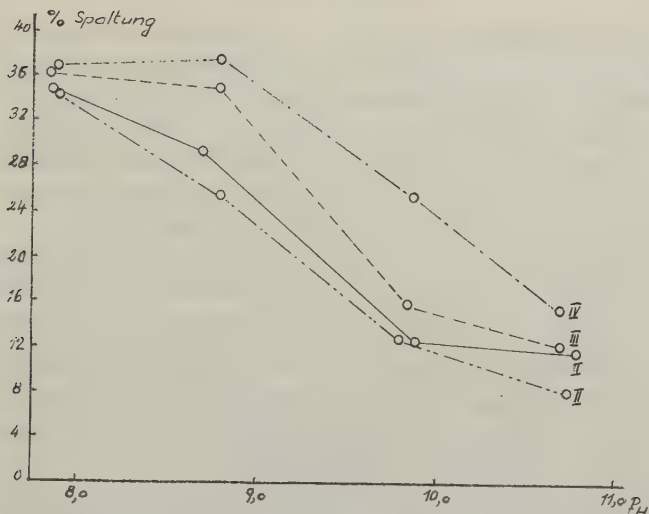


Abbildung 11

Die alkalische Hydrolyse von Mono-äthylphosphat in Gegenwart von Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer bei wechselnder Puffer- und Chlorid-Ionen-Konzentration

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 30 Min.; $t = 30^\circ$)

- I Zusatz von 7 ml Pufferlösung (2.5n) ○—○—○
 II Zusatz von 35 ml Pufferlösung (2.5n) ○- - -○- - -○
 III 7 ml Pufferlösung und Chlorid-Ionen-Konzentration verdoppelt ●- - -○
 IV 7 ml Pufferlösung und Chlorid-Ionen-Konzentration verfünffacht ○- - -○

2) Kaliumchlorid und Kaliumsulfat

In Anwesenheit von Kaliumchlorid kommt es ebenfalls zu einer Steigerung des Umsatzes. Für Kaliumsulfat trifft dies nur im sauren, neutralen und schwach alkalischen Bereich zu, und im stärker alkalischen Gebiet fällt die Aktivitäts- p_H -Kurve ab.

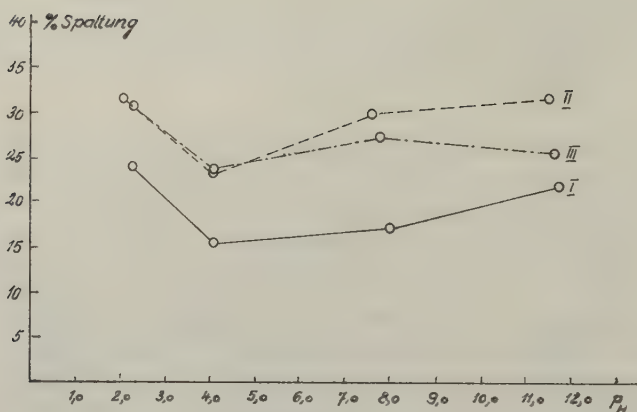


Abbildung 12

Aktivitäts- p_H -Kurven von Mono-äthylphosphat beim Zusatz von Kaliumchlorid bzw. Kaliumsulfat

(Der Versuchsansatz von 70 ml enthält 124 γ P/ml, entsprechend mol/250 Esterkonzentration; die Bestrahlungszeit beträgt 30 Min.; das p_H ist mit HCl bzw. KOH eingestellt; $t = 30^\circ$)

Mono-äthylphosphat	I	○ ——— ○ ——— ○
Mono-äthylphosphat + 7 ml 2.5n Kaliumchlorid	II	○ - - - - ○ - - - - ○
Mono-äthylphosphat + 7 ml 2.5n Kaliumsulfat	III	○ ······ ○ ······ ○

Nach diesen Befunden ist die Anwesenheit anorganischer, ionisierter Bestandteile im Reaktionsgemisch von großem Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit. In erster Linie scheinen hierbei Anionen von Bedeutung zu sein, da, wie orientierende Experimente zeigen, beim Austausch des Kaliumchlorids gegen Magnesiumchlorid gleiche Spaltungswerte erzielt werden.

V. Zusammenfassung

Bei der Hydrolyse aliphatischer Ester der Phosphorsäure durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ist das Ausmaß des Umsatzes sowohl von der Kettenlänge des organischen Restes als auch vom Grad der Veresterung abhängig. Abgesehen vom Mono-methylphosphat, dem eine Ausnahmestellung zukommt, nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit bei diesen Estern mit zunehmender Kettenlänge des organischen Teils ab, - und zwar nicht nur in der Reihe der geradkettigen sondern auch in derjenigen der isomeren Derivate. Aus Di- und Tri-Estern wird anorganisches Phosphat langsamer als aus den entsprechenden Mono-Estern abgespalten, doch sind, im Gegensatz zur metallionenkatalytischen und enzymatischen Hydrolyse, Phosphorsäure-tri-Ester ultravioletten Strahlen gegenüber nicht resistent.

Charakteristisch für alle untersuchten Substrate ist das Vorhandensein eines p_H -Wirkungs-Minimums zwischen p_H 4.0 und p_H 5.5, - in einem Bereich, in dem das Mono-Anion $ROPO_3H'$ in seiner höchsten Konzentration vorliegt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Wasserstoffionen-Hydrolyse in diesem p_H -Bereich zu einer maximalen Spaltung der Substrate.

Die Hydrolysegeschwindigkeit, - geprüft im Falle des Mono-äthylphosphats -, ist bei wechselnder Substratkonzentration lediglich von der Menge der eingestrahlten Lichtenergie abhängig.

In Anwesenheit von Fremdstoffen im Reaktionsgemisch findet man die Hydrolyse in bezug auf Ausmaß und auf die Abhängigkeit vom p_H -Wert geändert bzw. gestört. Die Verwendung von Puffern zur Fixierung der p_H -Werte muß daher entfallen.

B. Zur Methodik

I. Substrate

- 1) Mono-methylphosphat als $\text{CH}_3\text{O}_4\text{PbA}$ (247.4), dargestellt nach J. Cavalier (23), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 2) Mono-äthylphosphat als $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_4\text{PbA}$ (261.4), dargestellt nach J. Cavalier (23), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 3) Mono-n-propylphosphat als $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PbA}$ (275.4), dargestellt nach K. Asakawa (3), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 4) Mono-iso-propylphosphat als $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PbA}$ (275.4), dargestellt nach K. Asakawa (3), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 5) Mono-n-butylphosphat als $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4\text{P}(\text{NH}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (189.2), dargestellt nach R. Hotta (32).
- 6) Mono-iso-butylphosphat als $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4\text{P}(\text{NH}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$, (189.2), dargestellt in Übertragung des Verfahrens zur Gewinnung von Mono-n-butyl-phosphat nach R. Hotta (32).
- 7) Mono-n-amyolphosphat als $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_4\text{PbA}$ (303.4), dargestellt nach F. Falkenhausen, Freiherr v. (30), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 8) Mono-n-cetylphosphat als $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{PNa}_2$ (368.4), dargestellt nach J. Biehringer (21).
- 9) Di-äthylphosphat als $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{PO}_2\text{Ag}$ (261.0), dargestellt nach S. Uzawa (52), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 10) Tri-äthylphosphat als $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$ (182.1), Dr. Th. Schuchardt GmbH., München.
- 11) Propylenglykol-mono-phosphorsäure als $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_5\text{PbA}$ (291.4), dargestellt nach F. R. Atherton, H. T. Openshaw und A. R. Todd (4), nach Überführung in das Kaliumsalz.
- 12) Glycerin- α -phosphorsäure als $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{PCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (246.2), E. Merck, Darmstadt, List. Nr. 4111.
- 13) Glycerin- β -phosphorsäure als $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{PNa}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (306.2), Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

II. Lichtquelle

Als Strahlenquelle fand eine Labortauchlampe des Typs S 81 mit Vor-
schaltgerät von der Quarzlampen Gesellschaft mbH., Hanau, Verwendung.
Der Quecksilber-Hochdruckbrenner dieser Lampe besitzt folgende relative
spektrale Energieverteilung (bezogen auf 366 m μ):

Tabelle 3

Die relative spektrale Energieverteilung der Labortauchlampe Typ S 81

Wellen- länge in m μ	248	254	265	270	280	289	297	302	313	334	366	405/8	436
Rel. spektr. Energie- Verteilung	11	8	25	4	12	6	17	33	65	8	100	33	54

Da durch Verdampfung des Elektrodenmaterials die Strahlungsausbeute des
Brenners allmählich verringert wird, wurde die Lichtquelle in gewissen Zeitab-
ständen (nach ca. 50 h Betriebszeit) auf ihre Leistungsfähigkeit hin kontrolliert.
Als Bezugssubstanz ist Mono-äthylphosphat gewählt, von dem bei einem pH-Wert
von 8.0 (eingestellt mit 7 ml 2.5n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer auf
70 ml Reaktionsgemisch), aus einem Ansatz von 70 ml mol/250 Esterlösung nach
30minütiger Bestrahlung $35 \pm 2\%$ anorganisches Phosphat abgespalten sein mußten.

III. Der Versuchsansatz

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sowie die jeweiligen Bestrah-
lungszeiten sind bei den einzelnen Abbildungen angegeben. Für alle Versuche ist
in einem Blindversuch die Eigenspaltung des Substrats ohne Bestrahlung ermittelt
worden. Sie war, wie das Ergebnis der durchgeführten Null-Stoppungen, durchwegs
gering und wurde von der im Hauptversuch gemessenen Spaltung in Abzug gebracht.

Die Bestrahlung des Versuchsansatzes erfolgte in besonderen, mit Wasser ge-
kühlten Schliffkolben (siehe Abb. 13). Die dem Reaktionsgemisch entnommenen
und zur Messung gebrachten Proben betrugen in der Regel 5.0 oder 2.5 ml, bei
intensiver Spaltung des Substrats 1.0 bzw. 0.5 ml.

IV. Bestimmung des anorganischen Phosphats

Das bei der Spaltung der Ester entstehende anorganische Phosphat bestimmen wir nach der Methode von C. H. Fiske und Y. Subbarow (31), in der Modifikation von K. Schriever, E. Bamann und R. Toussaint (45), mit Hilfe eines lichtelektrischen Kolorimeters Modell VI nach B. Lange. Entstehende Trübungen bei Zugabe der Molybdän-Schwefelsäure, z.B. bei der Messung des abgespaltenen Phosphats aus Mono-n-cetylphosphat, trennten wir vor der Farbentwicklung durch Zentrifugieren ab.

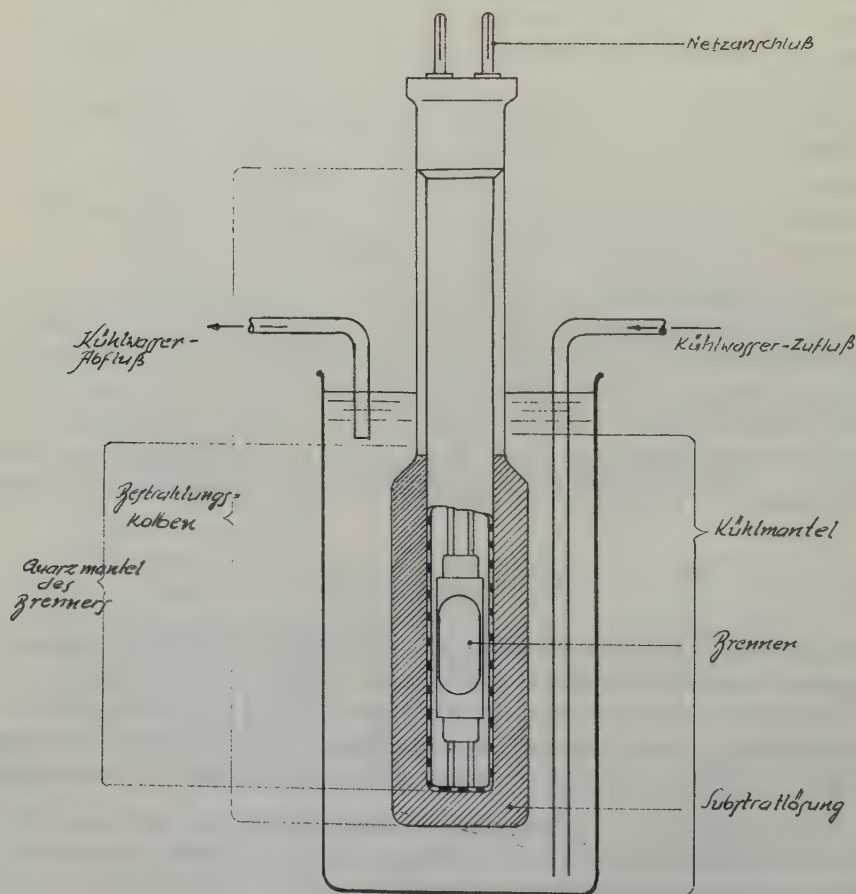


Abbildung 13

Die Versuchsanordnung

C. Literaturverzeichnis

- 1) Acker, L., W. Diemair u. R. Jäger, Biochem.Z. 322, 471 (1952)
- 2) Aldridge W.N., Biochem.J. 53, 110, 117 (1953)
- 3) Asakawa, K., J.Biochemistry 11, 157 (1929)
- 4) Atherton, F.R., H.T. Openshaw u. A.R. Todd, J.chem.Soc. 1945, 382.
- 5) Bailly, M. C., Bull.Soc.chim.France 9, D 314 (1942)
- 6) Bamann, E. u. A. Detter, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 289/61, 428 (1956)
- 7) Bamann, E. u. M. Meisenheimer, Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 1711 (1938)
- 8) Bamann, E. u. M. Meisenheimer, Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 1980 (1938)
- 9) Bamann, E. u. M. Meisenheimer, Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 2086 (1938)
- 10) Bamann, E. u. M. Meisenheimer, Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 2233 (1938)
- 11) Bamann, E. u. W.-D. Mütterlein, Chem.Ber. 91, 471 (1958)
- 12) Bamann, E. u. W.-D. Mütterlein, Chem.Ber. 91, 1322 (1958)
- 13) Bamann, E. u. J. Riehl, Chem.Ber. 88, 1556 (1955)
- 14) Bamann, E. u. J. Riehl, Biochem.Z. 327, 136 (1955/56)
- 15) Bamann, E. u. J. Riehl, Naturwissenschaften 44, 538 (1957)
- 16) Bamann, E., J. Riehl u. R. Nicolai, Biochem.Z. 328, 12 (1956/57)
- 17) Bamann, E. u. W. Salzer, Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 1263 (1937)
- 18) Bamann, E. u. H. Trapmann, Chem.Ber. 88, 199 (1955)
- 19) Bamann, E. u. H. Trapmann in F. F. Nord: Advances in Enzymology, Vol. XXI, Interscience Publishers Corp., New York 1959, S. 169
- 20) Bandurski, R. S. u. B. Axelrod, J. biol. Chemistry 193, 405 (1953)
- 21) Biehringer, J., Ber.dtsch.chem.Ges. 38, 3974 (1905)
- 22) Butcher, W. W. u. F. H. Westheimer, J. Americ. chem. Soc. 77, 2420 (1955)
- 23) Cavalier, J., Bull.Soc.chim.France 19, 883 (1898)
- 24) Desjobert, A., Bull.Soc.chim.France 14, D 809 (1947)
- 25) Desjobert, A., C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 224, 575 (1947)
- 26) Detter, A., Dissertation Universität München 1955
- 27) Ellis, C. u. A. A. Wells; The Chemical Action of Ultraviolet Rays, Reinhold Publishing Corp., New York 1941, S. 65
- 28) Ellis, C. u. A. A. Wells; The Chemical Action of Ultraviolet Rays, Reinhold Publishing Corp., New York 1941, S. 318
- 29) Ellis, C. u. A. A. Wells; The Chemical Action of Ultraviolet Rays, Reinhold Publishing Corp., New York 1941, S. 669
- 30) Falkenhausen, F., Freiherr v., Biochem.Z. 253, 152 (1932)
- 31) Fiske, C. H. u. Y. Subbarow, J. biol. Chemistry 66, 375 (1925)
- 32) Hotta, R., J.Biochemistry 20, 341 (1934)
- 33) Johnson, G. R. A., G. Scholes u. J. Weiss, Nature 177, 883 (1956)
- 34) Lipmann, F. u. L. C. Tuttle, J. biol. Chemistry 153, 571 (1944)

- 35) Masson, C. R., V. Boekelheide u. W. A. Noyes jr., Photochemical Reactions in: A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, Vol. II, Interscience Publishers, New York 1956, S. 261
- 36) Meyer, A. E. H. u. E. O. Seitz, Ultraviolette Strahlen, De Gruyter u. Co., Berlin 1949, S. 42
- 37) Mütterlein, W.-D., Dissertation Universität München 1957
- 38) O' Neill, J. J., T. Wagner-Jauregg, Y. Snider, C. Castle u. M. Stolberg, *Fédération Proc.* 14, Nr. 1 (1955)
- 39) Plotnikow, J., Allgemeine Photochemie, De Gruyter u. Co., Berlin 1936, S. 611
- 40) Riehl, J., E. Bamann u. W. Stadelmann, *Arch. Pharmaz. Ber. pharmaz. Ges.* 291/63, 628 (1958)
- 41) Schenck, G. O. in A. Schönberg: Präparative Organische Photochemie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, S. 210
- 42) Schenck, G. O. in A. Schönberg: Präparative Organische Photochemie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, S. 213
- 43) Scholes, G. u. J. Weiss, *Nature* 171, 920 (1953)
- 44) Scholes, G. u. J. Weiss, *Nature* 173, 267 (1954)
- 45) Schriever, K., E. Bamann u. R. Toussaint, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 97, 889 (1957)
- 46) Seraydarian, M. W., *Biochim. biophysica Acta* 19, 168 (1953)
- 47) Seraydarian, M. W., A. Canzanelli u. D. Rapport, *Amer. J. Physiol.* 172, 42 (1953)
- 48) Stein, G. u. J. Weiss, *J. chem. Soc.* 1949, 3256
- 49) Steiner, M. in E. Bamann u. K. Myrbäck: Die Methoden der Fermentforschung, Band 1, G. Thieme Verlag, Leipzig 1941, S. 776
- 50) Trapmann, H., *Arzneimittel-Forsch.* 9, 341 u. 403 (1959)
- 51) Ulich, H. u. W. Jost: Kurzes Lehrbuch der physik. Chemie, Dr. Steinkopff Verlag, Darmstadt 1955, S. 250
- 52) Uzawa, S., *J. Biochemistry* 15, 1 (1932)
- 53) Wagner-Jauregg, T. u. B. E. Hackley jr., *J. Amer. chem. Soc.* 75, 2125 (1953)
- 54) Wagner-Jauregg, T., B. E. Hackley jr., T. A. Lies, O. O. Owens u. R. Proper, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 922 (1955)

Lebenslauf

Am 20. August 1930 wurde ich als Sohn des Apothekers Dr. Hermann Gubitz in Heidenheim an der Brenz geboren. Dort besuchte ich von 1937 bis 1941 die Volksschule und anschließend die Hellensteinoberschule für Jungen, an der ich im Sommer 1950 die Reifeprüfung ablegte.

Von September 1950 bis Oktober 1952 war ich Apothekerpraktikant in der väterlichen Apotheke. Im September 1952 bestand ich das pharmazeutische Vorexamen. Das folgende Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen schloß ich im Mai 1956 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen ab. Seit September 1957 besitze ich die staatliche Approbation als Apotheker.

Im November 1956 begann ich mit den experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Professor Dr. Eugen Bamann am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München. Während dieser Zeit hörte ich auch Vorlesungen der Bakteriologie und nahm an mehreren Praktika teil.

